

准分子激光角膜磨镶术后患者泪液中基质金属蛋白酶-2的表达

陈爱蔚, 姬红培, 张唯伟, 顾 荃, 张志玲, 付举琴

基金项目: 贵州省科技厅基金资助[2011]025号; 贵州省卫生厅二〇〇八年科学技术基金项目

作者单位: (550002) 中国贵州省贵阳市, 贵州省人民医院眼科

作者简介: 陈爱蔚, 学士, 主任医师, 研究方向: 屈光矫正。

通讯作者: 姬红培, 硕士, 副主任医师, 研究方向: 眼前节疾病。

jihongpei@sina.com

收稿日期: 2014-06-23 修回日期: 2014-11-18

Expression of matrix metalloproteinase-2 in human tears fluid after LASIK

Ai-Wei Chen, Hong-Pei Ji, Wei-Wei Zhang, Hong Gu, Zhi-Ling Zhang, Ju-Qin Fu

Foundation items: Science and Technology Department Fund of Guizhou Province (No. [2011]025); Guizhou Provincial Health Department of Science and Technology Fund in 2008

Department of Ophthalmology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China

Correspondence to: Hong-Pei Ji. Department of Ophthalmology, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002, Guizhou Province, China. jihongpei@sina.com

Received: 2014-06-23 Accepted: 2014-11-18

Abstract

• **AIM:** To monitor long-term changes of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in human tears fluid after laser *in situ* keratomileusis (LASIK).

• **METHODS:** Thirty-two myopia cases (64 eyes) underwent uneventful LASIK were enrolled in the study. Tear fluid were collected and MMP-2 expression was analyzed by Western-bolt assay preoperatively and postoperatively on 15d, at 1, 3mo, and 1a.

• **RESULTS:** LASIK increased the concentration of MMP-2 in human tear fluid. At 15d postoperatively, the magnitude of MMP-2 was 1.4 times that of preoperative, thereafter subsided, but didn't return to preoperative level by 3mo ($P < 0.05$). Up to 1a after surgery, the concentration of MMP-2 almost recovered ($P > 0.05$).

• **CONCLUSION:** MMP-2 is significantly expressed in human tear fluid after LASIK, then subsided with time, but didn't return to preoperative level by 3mo and almost recovered up to 1a, indicating wound healing of LASIK would continue up at least 3mo after surgery and almost

recovered 1a postoperatively.

• **KEYWORDS:** laser *in situ* keratomileusis; matrix metalloproteinase-2; human; tear fluid

Citation: Chen AW, Ji HP, Zhang WW, *et al.* Expression of matrix metalloproteinase-2 in human tears fluid after LASIK. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2014;14(12):2229-2231

摘要

目的: 观察成功准分子激光角膜磨镶术(laser-assisted *in situ* keratomileusis, LASIK)术后人眼泪液中基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)的长期变化。

方法: 分别收集32例64眼LASIK手术的近视患者术前、术后15d;1,3mo;1a的泪液,进行Western-blot实验,检测MMP-2浓度的变化。

结果: LASIK手术导致术后患者泪液中MMP-2浓度增加。术后15d, MMP-2约为术前的1.4倍,随着术后时间的延长逐渐下降,术后3mo仍未恢复($P < 0.05$),术后1a几乎恢复至术前水平($P > 0.05$)。

结论: LASIK手术增加人眼泪液中MMP-2的浓度,且随着术后时间的延长逐渐下降,术后3mo仍未恢复,术后1a恢复至术前水平,表明LASIK诱发的创伤修复反应至少持续3mo,术后1a几乎恢复。

关键词: 准分子激光角膜磨镶术;基质金属蛋白酶-2;人;泪液

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2014.12.34

引用: 陈爱蔚, 姬红培, 张唯伟, 等. 准分子激光角膜磨镶术后患者泪液中基质金属蛋白酶-2的表达. 国际眼科杂志 2014; 14(12):2229-2231

0 引言

基质金属蛋白酶-2(matrix metalloproteinase-2, MMP-2)是一种明胶酶,降解IV胶原、VII胶原、层黏连蛋白等上皮基底膜及细胞外基质成分。在边缘性角膜溃疡、复发性角膜糜烂、感染性角膜溃疡患者的泪液中, MMP-2表达上调,当角膜完成创伤修复时, MMP-2恢复至基线水平^[1-9]。LASIK作为角膜屈光矫正主流手术之一,由于术中制作角膜基质瓣、切削基质组织,从而诱发了角膜的创伤修复反应, MMP-2可能参与了该过程。为此,我们分析手术成功的LASIK患者泪液中MMP-2表达及其动态变化,为研究LASIK手术创伤修复反应提供理论依据。

1 对象和方法

1.1 对象 在我院行 LASIK 手术,且术后除屈光回退外无明显并发症近视患者 32 例 64 眼,其中男 10 例 20 眼,女 22 例 44 眼,年龄 18~35(平均 21 ± 5.2)岁,屈光度数: $-3.00\sim -9.00D$,散光: $<-3.00D$ 。所有患者除屈光不正外均无其它眼部病变及手术史,排除了全身性疾病,所有患者均签署了知情同意书。

1.2 方法

1.2.1 主要仪器与试剂 法国 Moria2 角膜板层刀,德国鹰视酷眼准分子激光系统,兔抗人 MMP-2 多克隆抗体(美国 antibodies-online 公司),HRP 标记山羊抗兔 IgG(美国 Jackson 公司)。

1.2.2 手术方法 采用 Moria2 自动微型板层角膜刀和德国鹰视酷眼准分子激光机,激光能量为 $120\text{mJ}/\text{cm}^2$,频率为 40Hz,均采用单中心一次性切削法。术中做以上方为基底的角膜瓣,直径 8mm,厚度 $110\mu\text{m}$,在角膜基质床上行激光消融,复位角膜瓣。手术均由第二作者完成。

1.2.3 泪液收集 所有人泪液标本均根据自愿的原则,采集泪液:轻拉患者下眼睑,以无菌毛细玻璃管于颞下穹隆处(未使用表面麻醉药物),利用毛细玻璃管的虹吸作用收集泪液(尽量不接触眼表),将收集的左、右眼泪液转移至同一 Ep 管,置 -70°C 保存备用,以上操作由同一人在相同条件下完成。分别于术前、术后 15d;1,3mo;1a 采集泪液标本。LASIK 术后出现除屈光回退外影响视功能并发症患者排除本研究之外。

1.2.4 免疫印迹 Western-blot 法检测 MMP-2 蛋白的表达 MMP-2 蛋白样品中 $30\mu\text{g}$,加入 $2\times\text{SDS}$ 凝胶上样缓冲液,并将样品予沸水煮沸 5min,立即置冰上冷却。依次灌制 10% SDS-PAGE 分离胶,5% 浓缩胶,上样,浓缩胶 80V 电泳,当样品进入分离胶时改为 120V,直至溴酚蓝到达胶最底部时电泳结束。置转移缓冲液平衡凝胶和硝酸纤维素膜 10min,在 250mA 电转 1.5h。室温下用 TBST 封闭液(含 5% 脱脂奶粉、0.1% Tween20)封闭 1h。于 4°C 将膜与兔抗人 MMP-2 多克隆抗体(1:100)稀释液中孵育过夜。洗膜液(含 0.1% Tween20 的 TBST)洗膜 3 次 $\times 5\text{min}$ 。将膜置于 HRP(辣根过氧化物酶)标记的二抗(1:3000)稀释液中,室温振荡孵育 2h。洗膜液洗膜 $15\text{min}\times 3$ 次。暗室中将膜加上 ECL 发光剂,铺上保鲜膜,在化学发光成像系统中检测。以 GAPDH 为内参,用 MMP-2 与 GAPDH 的灰度值比值作为半定量指标。

统计学分析:采用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计学分析,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,进行方差分析,采用独立样本 *t* 检验对数据进行分析, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

LASIK 手术前后人眼泪液中 MMP-2 的浓度分别为:术后 15d 为 1.1193 ± 0.0180 ,术后 1mo 为 1.0653 ± 0.0403 ,术后 3mo 为 1.054 ± 0.0359 ,术后 1a 为 0.8175 ± 0.1442 ,术前为 0.78 ± 0.1533 ,术后各时间点 MMP-2 表达与术前比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。LASIK 术后人眼泪液

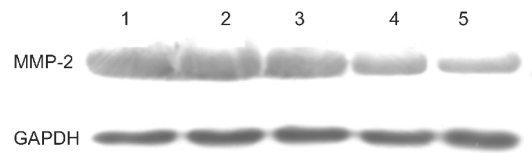


图 1 Western-blot 方法检测 MMP-2 蛋白的表达 1: 术后 15d;2: 术后 1mo;3: 术后 3mo;4: 术后 1a;5: 术前。

中 MMP-2 的浓度增加,且随着术后时间的延长逐渐下降(图 1)。术后 15d, MMP-2 约为术前 1.4 倍;术后 1mo 约 1.37 倍;术后 3mo 仍未恢复($P<0.05$),术后 1a 几乎恢复至术前水平($P>0.05$)。

3 讨论

尽管泪液不是角膜的组成成分,但其解剖结构、生理功能与角膜紧密相连。泪液中 MMP-2 表达增强时,可诱发角膜基底膜及细胞外基质成分的降解。因此,可以通过监测泪液中 MMP-2 的活动来反映角膜愈合进展情况。研究表明,成功 LASIK 手术后数月内的患者泪液中,另一种明胶酶即 MMP-9 仍然高表达^[10],但无同为明胶酶 MMP-2 的研究报道。Maguen 等^[11]在 LASIK 手术相关角膜瓣并发症的患者角膜瓣组织中发现, MMP-2 表达阳性;而在正常人或 LASIK 手术成功的患者角膜组织中, MMP-2 为阴性。我们的研究发现,即使是成功的 LASIK 手术,术后患者泪液中 MMP-2 的浓度增加,且于术后 1a,逐渐恢复至术前水平。我们的研究结果与 Maguen 等不一致的原因可能为,他们所研究的 LASIK 手术成功的角膜组织距离手术数年的缘故。

生理情况下,正常的角膜组织中存在 MMP-2,由角膜细胞合成,起着监督功能^[4]。当角膜受损后表达增强^[12],其主要作用是促进角膜组织的重塑^[13]。在我们的研究中,成功 LASIK 手术的患者泪液中, MMP-2 的浓度发生了动态的改变,术后 3mo 仍然增高,表明 LASIK 术后的创伤修复反应持续至少 3mo。Anderson 等^[14]病理组织学的研究表明, LASIK 术后的创伤修复反应可能长达 20mo。两者的差异可能是因为研究方法、观察指标不同的原因。由于 MMP-2 水平的恢复滞后于角膜的修复反应^[15],因此 LASIK 术后 1a 时 MMP-2 浓度的恢复可以间接地反映角膜修复反应的完成。

本研究中, MMP-2 浓度的监测开始于术后 15d, 因为有研究报道 MMP-2 于角膜创伤后 1wk 表达增加, 14d 大幅度增加, 28d 达到峰值^[16]。又因为 LASIK 术后存在干眼, 从而导致了早期泪液收集困难。

总之, 我们通过动态研究成功 LASIK 患者泪液中 MMP-2 的表达, 发现 LASIK 手术增加人眼泪液中 MMP-2 的浓度, 且随着术后时间的延长逐渐下降, 术后 3mo 仍未恢复, 术后 1a 恢复至术前水平, 表明 LASIK 诱发的创伤修复反应持续至少 3mo, 术后 1a 恢复。该结果可能为研究 LASIK 手术的角膜创伤修复反应提供理论依据。

参考文献

1 Smith VA, Hoh HB, Easty DL. Role of ocular matrix metalloproteinases in peripheral ulcerative keratitis. *Br J Ophthalmol*

1999;83(12):1376-1383

2 Sakimoto T, Shoji J, Yamada A, *et al* . Upregulation of matrix metalloproteinase in tear fluid of atients with recurrent corneal erosion.

Jpn J Ophthalmol 2007;51(5):343-346

3 Singh A, Maurya OP, Jagannadhan MV, *et al* . Matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) activity in corneal ulcer and ocular surface disorders determined by gelatin zymography. *J Ocul Biol Dis Infor* 2012;5(2):31-35

4 Ollivier FJ, Gilger BC, Barrie KP, *et al* . Proteinases of the cornea and preocular tear film. *Vet Ophthalmol* 2007;10(4):199-206

5 Sakimoto T, Sawa M. Metalloproteinases in corneal diseases: degradation and processing. *Cornea* 2012;31(S1):50-56

6 Hadassah J, Bhuvaneshwari N, Rao U, *et al* . Evaluation of succinylated collagen bandage lenses in corneal healing by the expression of matrix metalloproteinases (MMP-2 and MMP-9) in tear fluid. *Ophthalmic Res* 2009;42(2):64-72

7 Sakimoto T, Shoji J, Sawa M. Active form of gelatinases in tear fluid in patients with corneal ulcer or ocular burn. *Jpn J Ophthalmol* 2003;47(5):423-426

8 Ollivier FJ, Brooks DE, Van Setten GB, *et al* . Profiles of matrix metalloproteinase activity in equine tear fluid during corneal healing in 10 horses with ulcerative keratitis. *Vet Ophthalmol* 2004;7(6):397-405

9 Sakimoto T, Shoji J, Kanno H, *et al* . Gelatinase expression in ocular

surface disorders. *Jpn J Ophthalmol* 2004;48(1):17-22

10 González-Pérez J, Villa-Collar C, González-Méijome JM, *et al* . Long-term changes in corneal structure and tear inflammatory mediators after orthokeratology and LASIK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012 7;53(9):5301-5311

11 Maguen E, Zorapapel NC, Zieske JD, *et al* . Extracellular matrix and matrix metalloproteinase changes in human corneas after complicated laser-assisted in situ keratomileusis (LASIK). *Cornea* 2002;21(1):95-100

12 Ye HQ, Azar DT. Expression of gelatinases A and B, and TIMPs 1 and 2 during corneal wound healing. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998;39:913-921

13 晏晓明, 王晓飞, 吴静安. 转化生长因子 β 调节培养的人角膜基质细胞 MMP-2 和 MMP-9 的分泌. *眼科研究* 2000;18(4):292-294

14 Anderson NJ, Edelhauser HF, Sharara N, *et al* . Histologic and ultrastructural findings in human corneas after successful laser in situ keratomileusis. *Arch Ophthalmol* 2002;120(3):288-293

15 Wang L, Pan Q, Xue Q, *et al* . Evaluation of matrix metalloproteinase concentrations in precorneal tear film from dogs with *Pseudomonas aeruginosa*-associated keratitis. *Am J Vet Res* 2008;69:1341-1345

16 Girard MT, Matsubara M, Kublin C, *et al* . Stromal fibroblasts synthesize collagenase and stromelysin during long-term tissue remodeling. *J Cell Sci* 1993;104(4):1001-1011